PCT/KR 03/02415

BEST AVAILABLE COPY

RO/KR 19.11.2003

REC'D 02 DEC 2003
WIPO PCT

대 한 민 국 특 허 청
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

출 원 번 호 : 10-2002-0069589
Application Number

출 원 년 월 일 : 2002년 11월 11일
Date of Application NOV 11, 2002

출 원 인 : 학교법인고려중앙학원
Applicant(s) KOREA CHUNGANG EDUCATIONAL FOUNDATION

2003 년 11 월 08 일

특 허 청
COMMISSIONER

【서지사항】

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【참조번호】 0001

【제출일자】 2002.11.11

【국제특허분류】 C12N

【발명의 명칭】 참깨에서 유래된 식물체 종자 특이적 발현 프로모터 및 이를 함유하는 식물체 종자 특이적 발현 벡터

【발명의 영문명칭】 Plant seed-specific expression promoter derived from sesame and seed-specific expression vector comprising the promoter

【출원인】

【명칭】 학교법인 고려중앙학원

【출원인코드】 2-1995-276862-2

【대리인】

【성명】 이영필

【대리인코드】 9-1998-000334-6

【포괄위임등록번호】 2002-018861-4

【대리인】

【성명】 이해영

【대리인코드】 9-1999-000227-4

【포괄위임등록번호】 2002-018862-1

【발명자】

【성명의 국문표기】 서미정

【성명의 영문표기】 SUH,Mi Chung

【주민등록번호】 650409-2017619

【우편번호】 143-761

【주소】 서울특별시 광진구 구의3동 현대프라임아파트 13동 1101호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김미정

【성명의 영문표기】 KIM,Mi Jung

【주민등록번호】 731030-2841912

【우편번호】 134-031
【주소】 서울특별시 강동구 성내1동 467-7
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 김희자
【성명의 영문표기】 KIM,Hee Ja
【주민등록번호】 760916-2663618
【우편번호】 158-092
【주소】 서울특별시 양천구 신월2동 606-10 대양연립 103호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 정정한
【성명의 영문표기】 CHUNG,Chung Han
【주민등록번호】 480229-1018414
【우편번호】 604-081
【주소】 부산광역시 사하구 괴정1동 1065번지 괴정 자유3차아파트 111호
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 3
【서열목록의 전자파일】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
이영필 (인) 대리인
이해영 (인)
【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원	
【가산출원료】	8 면	8,000 원	
【우선권주장료】	0 건	0 원	
【심사청구료】	8 항	365,000 원	

【합계】 402,000 원
【감면사유】 학교
【감면후 수수료】 201,000 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 참깨의 마이크로좀 올레산 불포화제(microsomal oleic acid desaturase) (*Si*-FAD2) 게놈 유전자에서 유래된 식물체 종자 특이적 발현 프로모터, 이 프로모터를 함유하는 식물체 종자 특이적 발현 벡터 및 이 종자 특이적 발현 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다.

본 발명은 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법에 관한 것으로써, 본 발명은 식물체의 종자 특이적으로 유용물질을 생산하거나, 기존의 종자 내 생산 물질을 기능적으로 변형시키고자 하는 형질전환 식물체 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

【대표도】

도 4a

【명세서】

【발명의 명칭】

참깨에서 유래된 식물체 종자 특이적 발현 프로모터 및 이를 함유하는 식물체 종자 특이적 발현 벡터{Plant seed-specific expression promoter derived from sesame and seed-specific expression vector comprising the promoter}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 참깨 유래 마이크로좀 올레산 불포화제(microsomal oleic acid desaturase), *Si*-FAD2 유전자의 염기서열과 이로부터 연역된 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 *Si*-FAD2 게놈 유전자를 모식화하여 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 *Si*-FAD2 게놈 유전자의 프로모터 부위의 염기서열을 나타낸 것이다.

도 4a는 본 발명의 *Si*-FAD2 게놈 유전자의 프로모터 영역을 GUS 유전자가 함유된 pBI101에 삽입하여 제조된 본 발명의 바이너리(binary) 벡터 (pBin*Si*FAD2-GUS)를 나타내는 모식도이다.

도 4b는 본 발명의 *Si*-FAD2 유전자의 프로모터가 함유된 바이너리 벡터(pBin*Si*FAD2-GUS) 혹은 CaMV35S 프로모터가 함유된 바이너리 벡터 (pBI121)로 형질전환된 *Agrobacteria*를 바이너리 벡터내에 존재하는 유전자 특이적 프라이머(primer)를 이용하여 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 4c는 본 발명의 pBin*Si*FAD2-GUS 혹은 pBI121으로 형질전환된 *Agrobacteria*를 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 식물체의 꽃 조직에 접종함으로써 형질전환된 애기장대를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 pBin*Si*FAD2-GUS를 가진 *Agrobacteria*를 이용하여 애기장대를 형질전환시킨 다음, 형질전환 식물체의 각 조직별 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법으로 조사한 것이다.

도 6a은 본 발명의 pBin*Si*FAD2-GUS를 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대의 각 조직별 GUS 활성을 상대적인 효소 활성도(%)로 나타낸 것이다.

도 6b는 본 발명의 pBin*Si*FAD2-GUS 혹은 pBI121을 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대들의 종자 발달 단계별 GUS 활성을 상대적인 효소 활성도(%)로 나타낸 것이다.

도 7a는 본 발명의 *Si*-FAD2 유전자의 프로모터 영역을 GUS 유전자가 함유된 pBI221에 삽입하여 제조된 본 발명의 트랜전트(transient) 발현 벡터 (p*Si*FAD2-GUS)를 나타내는 모식도이다.

도 7b는 본발명의 p*Si*FAD2-GUS를 참깨의 발달하는 종자에 입자 폭격(particle bombardment) 방법에 의거하여 도입한 다음, 종자에서 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법으로 조사한 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

2> 본 발명은 참깨의 마이크로좀 올레산 불포화제(microsomal oleic acid desaturase) (*Si*-FAD2) 게놈 유전자에서 유래된 식물체 종자 특이적 발현 프로모터, 이 프로모터를 함유하는 식물체 종자 특이적 발현 벡터 및 이 종자 특이적 발현 벡터로 형질전환된 식물체에 관한 것이다.

<13> 식물체내의 지방산들은 세포막과 종자 내 저장 오일을 이루는 중요한 구성 성분이다. 특히 마이크로좀 올레산 불포화제는 세포 내 소포체 (endoplasmic reticulum) 막에 존재하여 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)의 *sn*-1 과 *sn*-2 위치에 존재하는 일중 불포화지방산, 올레산(oleic acid)를 이중 불포화 지방산, 리놀레산(linoleic acid)로 전환되는 반응을 촉매하는 효소이다.

<14> *Arabidopsis*, 페츄니아, 그리고 면화에서 마이크로좀 올레산 불포화제 게놈 유전자가 보고되었으며, *Arabidopsis*는 게놈 상에 이 유전자가 1개, 그 외의 다른 식물체에는 2개 이상의 유전자가 존재하는 것으로 알려져 있다 (Okuley et al., 1994, Plant Cell; Verwoert et al., 2000, Biochemistry Society Transactions; Pirtie et al., 2001, Biochimica et Biophysica Acta). 특히, 이 유전자가 2개 이상 존재할 경우, 적어도 한 개의 유전자는 종자 오일에 존재하는 리놀레산(linoleic acid) 생산에 관여하는 것으로 알려졌다. 현재까지 상기 3종류의 식물체로부터 마이크로좀 올레산 불포화제 게놈 유전자가 보고되었으나, 그의 프로모터에 대한 연구는 전 세계적으로 전혀 이루어지지 않았다.

<15> 최근에 유전 공학 기술을 이용하여 식물의 형질을 개량시키고자 하는 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 과정에서 외래의 유용 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키고자 할 때 유전자 발현에 관여하는 프로모터가 요구된다. 이를 위해 종래에는 식물체의 전 조직에서 발현이 유도되는 꽃양배추 모자이크 바이러스 (cauliflower mosaic virus; CaMV35S) 유전자 유래의 프로모터가 널리 사용되어졌다. 그러나, 이 프로모터는 종자의 특정 조직에만 발현을 조절할 수 없는 단점이 있다. 또한 종자 (Plant Cell Technology, 1991, 3: 568-576), 잎과 꽃 (Science, 1990, 250: 931-936), 괴경 (Plant Cell Technology, 1991, 3: 577-587) 등의 조직 특이적 발현을 유도하는 프로모터가 보고되어 졌다. 그러나, 상기 종자 특이적 발현 프로모터

도 그 발현 시기가 종자의 전 발달 단계에 주로 발현되는 것으로써 이는 종자의 특정 발달 시기에만 특이적으로 발현을 조절할 수 없는 단점이 있다.

:16> 이에 본 발명자들은 참깨로부터 유래된 마이크로좀 올레산 불포화제가 종자 발달 단계 특이적으로 발현되는 것에 착안하여 그의 게놈 유전자 및 프로모터를 클로닝한 후, 프로모터를 바이너리(binary) 벡터 및 트랜전트(transient) 발현 벡터에 삽입하여 모델 식물체인 *Arabidopsis* 및 참깨 종자에 도입한 결과, 참깨 유래 마이크로좀 올레산 불포화제 게놈 유전자의 프로모터는 외래 도입 유전자를 종자 발달 단계 특이적으로 발현시키는 신규 프로모터임을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

17> 따라서, 본 발명의 목적은 참깨의 마이크로좀 올레산 불포화제(microsomal oleic acid desaturase) (*Si*-FAD2) 게놈 유전자에서 유래된 식물체의 종자 특이적, 특히 종자 발달 단계 특이적으로 발현되는 프로모터를 제공하는 것이다.

18> 본 발명의 다른 목적은 위의 식물체 종자 특이적 발현 프로모터를 함유하는 식물체 종자 특이적 발현 벡터 및 이 종자 특이적 발현 벡터로 형질전환된 식물체를 제공하는 것이다.

.9> 본 발명의 또 다른 목적은 식물체의 종자 발달 단계 특이적으로 유용물질을 생산하거나, 기존의 종자 내 생산 물질을 기능적으로 변형시키고자 하는 경우, 위의 프로모터를 이용하여 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

0> 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 식물체의 종자 특이적 발현 프로모터를 제공한다.

<21> 상기 서열번호 3의 염기서열은 본 발명에서 처음 클로닝되고 염기서열분석된 종자 특이적으로 발현되는 참깨의 마이크로좀 올레산 불포화제(microsomal oleic acid desaturase) (*Si*-FAD2) 게놈 유전자의 전사 개시 부위로부터 -1 내지 -660 부위의 염기서열에 해당된다. 따라서, 이 서열은 식물체 유전자의 전사 개시 부위 인식을 위한 프로모터의 공통서열인 TATA와 CAAT box(서열번호 3의 -31와 -155에 위치)를 함유하며 또한 종자 특이적 전사 활성을 조절하는 부위를 포함할 것으로 기대된다.

<22> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 식물체의 종자 특이적 발현 프로모터를 함유하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터를 제공한다.

<23> 바람직하게는, 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터는 상기 프로모터가 바이너리(binary) 벡터의 외래 유전자 앞에 삽입된 것을 특징으로 한다. 본 발명에 이용될 수 있는 바이너리 벡터는 *A. tumefaciens*의 Ti 플라스미드와 함께 존재시 식물체를 형질전환시킬 수 있는 T-DNA의 BR과 BL을 함유하는 어떤 바이너리 벡터도 될 수 있으나, 바람직하게는 당업계에서 용이하게 입수가능한 pBI101 (Clontech, 미국)를 사용하는 것이 좋다. 또한, 본 발명에 사용될 수 있는 외래 유전자는 해당 식물체에 발현되길 원하는 외부 유래의 어떤 표적 유전자 또는 리포터 유전자도 포함한다.

<24> 상기 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터에서, 본 발명의 프로모터는 바이너리 벡터에 함유된 외래 유전자와 전사(transcription) 작동가능하게 결합되어 있으며, 본 발명에서는 그 한 예로서 리포터 유전자인 GUS 유전자가 함유된 pBI101에 본 발명의 프로모터를 삽입하여 제조된 바이너리 벡터 (pBin*Si*FAD2-GUS)(도 4a)를 이용하여 *Arabidopsis*를 형질전환시켰다(실시예 4 참조).

<25> 바람직하게는, 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터는 상기 프로모터가 트랜전트(transient) 발현 벡터의 외래 유전자 앞에 삽입된 것을 특징으로 한다. 본 발명에 이용될 수 있는 트랜전트 발현 벡터는 외래 유전자를 도입된 식물체내에서 일시적으로 발현될 수 있도록 제작된 어떤 트랜전트 발현 벡터도 될 수 있으나, 바람직하게는 당업계에서 용이하게 입수가능한 pBI221 (Clonetech, 미국)을 사용하는 것이 좋다. 또한, 본 발명에 사용될 수 있는 외래 유전자는 해당 식물체에서 발현되길 원하는 외부 유래의 어떤 표적 유전자 또는 리포터 유전자도 포함한다.

<26> 상기 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터에서, 본 발명의 프로모터는 트랜전트 발현 벡터에 함유된 외래 유전자와 전사(transcription) 작동가능하게 결합되어 있으며, 본 발명에서는 그 한 예로서 리포터 유전자인 GUS 유전자가 함유된 pBI221에 본 발명의 프로모터를 삽입하여 제조된 트랜전트 발현 벡터(p*Si*FAD2-GUS)(도 7a)를 이용하여 참깨 종자를 형질전환시켰다(실시예 5 참조).

<27> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 상기 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다.

<28> 상기 식물체 종자 특이적 발현 벡터가 바이너리 벡터인 경우에는 Floral dip 방법(Clough 와 Bent, 1998, The Plant Journa)에 따라 식물체를 형질전환시키고, 트랜전트 발현 벡터인 경우에는 Particle bombardment 방법 (Lacorte et al., 1997, Plant Cell Reports)에 따라 식물체를 형질전환시킬 수 있다. 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터는 쌍자엽 혹은 단자엽 식물에 상관없이 어떤 식물체도 형질전환 시킬 수 있으나, 본 발명에서는 그 예로서 *Arabidopsis* 와 참깨(*Sesame indicum* cv.)의 형질전환만을 실시하였다(실시예 4, 5 참조).

29> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터를 이용하여 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법을 제공한다.

30> 상기 외래 유전자는 식물체에서 발현을 원하는 어떤 유전자도 될 수 있으며, 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터에서 상기 프로모터의 뒤에 위치하며 필요에 따라 리포터 유전자와 융합되어 발현될 수도 있다.

31> 본 발명은 식물체 종자 특이적으로 발현이 유도되는 마이크로좀 올레산 불포화제 (microsomal oleic acid desaturase) 게놈 유전자의 종자 특이적 프로모터 및 이 프로모터를 사용하여 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법에 관한 것으로써, 본 발명은 마이크로좀 올레산 불포화제 게놈 유전자의 프로모터와 형질전환 식물체 제조 방법을 이용하여 식물체의 종자 발달 단계 특이적으로 유용물질을 생산하거나, 기존의 종자 내 생산 물질을 기능적으로 변형시키고자 하는 형질전환 식물체 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

32> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

33> **(실시예 1) 참깨에서 유래된 microsomal oleic acid desaturase (*Si*-FAD2) 게놈 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석**

34> 참깨의 종자 특이적 *Si*-FAD2 유전자의 게놈(genomic) 클론을 확보하기 위하여 참깨(*Sesame indicum* cv. 양백)의 어린잎으로부터 genomic DNA를 추출(Dellaporta et al., 1984, in Molecular Biology of Plants)하였다. Jin et al. (2001, Plant Science)에 의해 보고된 cDNA 염기서열에 근거해서 Forward primer W6-1 (5'-GACAAAATGGGAGCCGGAGGACGCATGT-3')과 Reverse

primer W6-R1 (5'-CGGCTTCAGAACTTGTTCTTGTACCAGA-3')를 제작한 후 중합효소 연쇄 반응 (Polymerase Chain Reaction, 이하 'PCR'로 약칭함) 방법을 이용하여 참깨 FAD2 (microsomal oleic acid desaturase) 유전자에 대한 게놈 클론을 분리하였다. 분리된 게놈 클론은 pGEM-T 벡터(Promega, 미국)에 클로닝한 후, ABI Bigdye cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems, 미국)을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 보고되어진 cDNA (GenBank Accession No: AF192486)와 비교하였을 때, cDNA의 5' 말단에 존재하는 9 bases (CGGCACGAG)를 제외한 전 염기서열이 동일한 클론임이 확인되었다. *Si*-FAD2 유전자의 genomic 클론은 coding region에는 intron이 존재하지 않았으며, 5' untranslated region 내에 1574 base에 해당하는 1개의 큰 intron이 존재하였다. *Si*-FAD2 유전자의 염기서열(서열번호 1)과 이로부터 연역된 아미노산 서열(서열번호 2)을 도면 1에 나타내었다. 붉은 색 글씨의 첫 번째 염기 A는 전사 개시 부위를 나타내며, 이탤릭체로 나타낸 부분(*GT-AG*)은 5'untranslated region 내에 존재하는 intron 부분에 해당한다.

<15> (실시예 2) *Si*-FAD2 유전자의 5' upstream region 확보 및 염기서열 분석

<16> 참깨의 종자특이적 *Si*-FAD2 프로모터 부위를 클로닝하기 위하여 *Si*-FAD2 genomic 유전자의 염기서열과 Nde I 제한효소 부위를 이용하여 inverse PCR을 수행하였다. Invese PCR은 보통 프로모터와 같은 미지의 영역을 탐색하는데 있어서 많이 사용되어지고 있다(Digeon et. al., 1999, Plant Molecular Biology). Inverse PCR을 수행하기 위해 genomic DNA를 Nde I제한효소로 완전히 절단한 뒤, T4 DNA Ligase (BM, 독일)를 이용하여 self ligation을 시켜 이것을 template로 사용하였다. Inverse PCR은 specific한 PCR 산물을 얻기 위해 2단계로 진행이 되는데, 우선 1st PCR을 유전자 특이적 primers (W6-1; 5'-GACAAAATGGGAGCCGGAGGACGCATGT-3' 과 W6-R6; 5'-GGGGGCACGTTACCTGAAAACTTGGAAG-3')를 사용해 얻어진 PCR 산물을 다시 안쪽 primers

(W6-2; 5'-GGCTTTGGGACGAAGACTTCGTCACGCT-3', W6-R7; 5'-CGCGTGAAAGCACTTCTGCGGAAGCGC-3')를 이용해서 2nd PCR을 실시했다. 그 결과 약 750 bases에 해당하는 *Si*-FAD2 genomic 유전자의 5' upstream region(-660 내지 +90)을 확보하였다. 도 2a는 본 발명의 참깨 유래 microsomal oleic acid desaturase, *Si*-FAD2 게놈 유전자를 모식화하여 나타낸 것으로서, SiW6F1, SiW6R1, W6R3, W6R5, 그리고 W6R1은 아래 도2(B)에서 사용될 primers의 위치를 나타낸 것이다.

<37> 확보된 부위가 정확히 *Si*-FAD2 genomic 유전자의 5' upstream region인지를 확인하기 위하여 750 bases의 5' 말단 및 *Si*-FAD2 genomic 유전자의 염기서열에 근거하여 유전자 특이적인 primers (SiW6F1, SiW6R1, W6R1, W6R3 및 W6R5)를 제작하여 PCR을 수행한 결과, 정확히 약 750 bases에 해당하는 부위가 *Si*-FAD2 genomic 유전자의 5' upstream 부위임을 확인하였다. 도 2b는 참깨의 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 도 2a에서 보여지는 primers를 이용하여 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이고, M1, M2는 DNA size 마커이고; 제 1열은 SiW6F1 (5'-CCGAAGCTTCATATGTGAAATGTAATGGAAAATGCGAC3')과 SiW6R1 (5'-GAACCTAGGAACCTTCCTCTTTAGCGCACTTTCGTG-3')을 사용하여 얻은 PCR 산물이고; 제 2열은 SiW6F1과 W6R1 (5'-CGGCTTCAGAACTTGTTCTTGTACCAGA-3')을 사용하여 얻은 PCR 산물이고; 제 3열은 SiW6F1과 W6R5 (5'-GGAGAACGAACGGCTGACGGATCTCTCG-3')를 사용하여 얻은 PCR 산물이고; 제 4열은 SiW6F1과 W6R3 (5'-GGCTTTGGG ACGAAGACTTCGTCACGCT-3')를 사용하여 얻은 PCR 산물이다. 상기 *Si*-FAD2 genomic 유전자의 5' upstream region 부위의 염기서열을 분석 한 후, 그중 전사개시 부위로부터 -1 내지 -660인 프로모터 부위의 염기서열(서열번호 3)을 도면 3에 나타내었다.

<38> (실시예 3) *Si*-FAD2 유전자의 전사개시 부위 확인

<39> 참깨의 종자특이적 *Si*-FAD2 유전자의 프로모터 부위의 활성을 조사하기 위해서는 이 유전자의 정확한 전사개시 부위가 확인되어야 하므로 cRACE (circular first-strand cDNA-mediated rapid amplication of cDNA ends) 방법 (Maruyama et al., 1995, Nucleic Acid Research)에 의거하여 *Si*-FAD2 유전자의 전사개시 부위를 확인하는 연구가 수행되었다. 수행과정을 보면 우선 참깨의 종자로부터 전체 RNA를 분리한 후, T4 polynucleotide kinase(TAKARA)에 의해 인산화된 gene specific primer (GGTAGCAGTATGGGGATGGCAGCAGATGGAAGTA)와 역전사 효소 (reverse transcriptase, BM)를 이용하여 cDNA를 합성한 다음, T4 RNA ligase (NEB)를 이용하여 5' 말단과 3' 말단을 연결한다. 이를 주형으로 유전자 특이적 primers (W6-5 ; 5'-GAAGAACCCCCTCCAACGGGTGCC-3'와 W6-R9; 5'- CCGATCACATCGCAAGTGCGATACACCTG-3')를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 도면1에서 첫 번째 염기(붉은 색) "A"가 전사 개시 (transcription initiation)부위로 확인되었다.

<40> (실시예 4) *Arabidopsis* 형질전환에 의한 *Si*-FAD2 유전자 프로모터의 활성 분석

<41> *Si*-FAD2 유전자 프로모터의 발현 양상을 분석하기 위하여 클로닝된 Si-FAD2 유전자의 프로모터를 GUS reporter 유전자를 함유하는 binary 벡터 pBI101 (Cat. # 6017-1, Clonetech, 미국)의 HindIII 와 BamHI 제한효소 부위에 참깨의 게놈 DNA를 주형으로 SiW6F1 (5'-CCGAAGCTTCATATGTGAAATGTAATGGAAAATGCGAC-3') 와 SiW6R1 (5'-GAACCTAGGAACCTTCCTCTTTAGCGCACTTTCGTG)을 사용하여 pcr을 수행한 결과 *Si*-FAD2 유전자 프로모터 부위를 획득하였고, 이를 *Hin*dIII와 *Bam*HI으로 절단한 뒤 pBI101 벡터의 *Hin*dIII와 *Bam*HI 위치에 삽입하여 pBin*Si*FAD2-GUS라는 binary vector를 제조하였다. 도 4a는 pBin*Si* FAD2-GUS binary vector를 나타내는 모식도로서, 여기서 GUS는 β-Glucuronidase를 코딩하는

리포터 유전자이고, NPTII는 Neomycin Phosphotransferase II를 코딩하는 kanamycin 저항성 마커 유전자이고, Nos-pro와 Nos-ter는 NPTII의 식물체 발현 프로모터와 터미네이터이다.

12> 상기와 같이 제조된 pBin*Si*FAD2-GUS의 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Suh et al., 2002, Molecules and Cells)내로의 도입은 Freeze-thaw 방법(An, G. 1987, Mothods in Enzymology)에 근거하여 수행하였다. Agrobacteria를 O.D.=0.5가 되도록 YEP 배지에서 현탁 배양한 후, 20 mM $CaCl_2$ 용액에 현탁한 다음, pBin*Si*FAD2-GUS binary vector와 혼합하여 액체질소에 1분간 방치한 후, 37 °C에서 2분간 배양함으로써 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1내로 도입하였다. 도 4b는 도 4a에서 보여지는 pBin*Si*FAD2-GUS binary 벡터와 CaMV35S 프로모터가 함유된 binary 벡터 pBI121 (Cat. # 6018-1, Clonetech, 미국)를 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1로 각각 도입한 후, 형질전환된 *Agrobacteria*를 binary vector내에 존재하는 유전자 특이적 primers를 이용하여 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이다. M은 DNA size 마커이고; N은 pBI121 binary 벡터를 가진 *Agrobacteria*와 SiW6F1과 SiW6R1을 사용하여 얻은 PCR 산물(negative control)이고; P는 pBin*Si*FAD2-GUS binary 벡터를 가진 대장균과 SiW6F1과 SiW6R1을 사용하여 얻은

PCR 산물 (positive control)이고; SS는 pBin*Si*FAD2-GUS binary 벡터를 가진 *Agrobacteria*와 SiW6F1과 SiW6R1을 사용하여 얻은 PCR 산물이고; SN는 pBin*Si*FAD2-GUS binary 벡터를 가진 와 npt II 유전자 (kanamycin 저항성 마커 유전자)내의 primers (Forward primer : 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' 와 reverse primer: 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3')를 사용하여 얻은 PCR 산물이고; V는 pBI121 binary vector를 가진 *Agrobacteria*와 nptII 유전자내의 primers (상동)를 사용하여 얻은 PCR 산물로써 nptII primer를 사용한 경우 약 700 bp의 PCR 산물은 얻을 수 있었고, SiW6F1과 SiW6R1등의 유전자 primer를 이용한 경우 약 750bp의 PCR산물을 얻을 수 있었다. 도 4b 로부터 pBin*Si*FAD2-GUS와 pBI121 binary vector가 Agrobacteria 내로 도입되었음을 확인하였다.

43> 애기장대 (*Arabidopsis thaliana* cv. columbia) 꽃 조직에 pBin*Si*FAD2-GUS 혹은 pBI121 binary vector가 각각 도입된 *Agrobacteria*를 2일동안 28 ºC에서 진탕 배양한 후, floral dip 방법 (Clough 와 Bent, 1998, The Plant Journal) 에 근거하여 애기장대의 개화직전 암술머리에 접종함으로써 애기장대를 형질전환시켰다. 도 4c는 도 4b의 pBin*Si*FAD2-GUS 혹은 pBI121 binary vector를 가진 *Agrobacteria*를 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 식물체의 꽃 조직에 접종함으로써 애기장대를 형질전환시킨 것을 나타낸 것이다. a는 pBI121 binary vector를 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대이고; b는 pBin*Si*FAD2-GUS binary vector를 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대이다.

4> 형질전환한 결과 kanamycin (30 mg/ml)에 저항능을 가진 형질전환 식물체를

선별하여 식물체의 각 조직으로부터 *Si*-FAD2 유전자의 프로모터에 의해 발현이 조절되는 외래 도입 유전자, β-glucuronidase (GUS) 활성을 조직 화학적 염색 방법 및 효소학적 방법을 이용하여 조사하였다. 도 5는 *Si*-FAD2 유전자 프로모터 하에 GUS가 함유된 binary 벡터를 가진 를 이용하여 애기장대를 형질전환 시킨 다음, 형질전환 식물체의 각 조직별 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법으로 조사한 것이다. (A)는 형질전환 되지 않은 애기장대이고; (B)는 pBI121을 함유한 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대이고; (C)는 pBin*Si*FAD2-GUS binary vector를 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대이다.

45> 도 6a는 *Si*-FAD2 유전자의 프로모터 하에 GUS 유전자가 함유된 binary vector를 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대의 각 조직별 GUS 활성을 조사하여 가장 낮은 활성도를 1%라 정하여 그들의 상대적인 효소 활성도를 나타낸 것이다. 종자는 개화 후 발달 단계별 (종자1; 개화 후 5 - 7일, 종자2; 개화 후 10 - 15일, 종자3; 개화 후 20 -25일)로 채취하여 시료로 사용하였다. 도 6b는 pBin*Si*FAD2-GUS binary 벡터 혹은 pBI121을 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대들의 종자 발달 단계별 GUS 활성을 조사한 다음, 가장 낮은 활성도를 1%라 정하여 그들의 상대적인 효소 활성도를 비교하여 나타낸 것이다. 도 5 및 도 6a, b로부터 참깨 유래 *Si*-FAD2 유전자의 프로모터하의 GUS는 애기장대 종자 특이적으로 발현하며 특히 개화 후 10일에서 25일 사이의 발달 종자에서 가장 강한 발현을 나타냄을 확인하였다. 특히, 종자 발달 2기 와 3기에서 그 발현양은 CaMV35S 프로모터에 비해 5배 적게 발현됨을 확인하였다. 이는 참깨 유래 *Si*-FAD2 유전자의 프로모터가 종자 특이적이며, 특히 종자 발달 단계 특이적으로 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터임을 제시한다.

46> (실시예 5) 참깨 종자 내 *Si*-FAD2 유전자 프로모터의 활성 분석

<47> 모델 식물체인 애기장대 뿐만 아니라 참깨 종자 내에서 *Si*-FAD2 유전자 프로모터의 활성을 조사하기 위하여, 실시예 4에서 사용한 HindIII 와 BamHI 제한 효소 부위를 갖는 Si-FAD2 genomic 유전자의 프로모터를 외래 유전자 발현을 일시적으로 볼 수 있는 transient expression vector인 pBI221 (Cat. # 6019-1, Clonetech, 미국)에서 CaMV35S 프로모터를 HindIII 와 BamHI 제한효소 부위를 이용하여 제거한 다음, 동일한 위치에 삽입하였다. 이로써 Si-FAD2 genomic 유전자의 프로모터가 삽입된 transient expression vector, pSiFAD2-GUS 를 제조하였다. 도 7a는 상기와 같이 제조된 transient expression vector(p*Si*FAD2-GUS)를 나타내는 모식도로서, 여기서 GUS는 β-Glucuronidase를 코딩하는 리포터 유전자이고, Nos-ter는 nopaline synthase 유전자의 유전자 발현 터미네이터이다.

<48> p*Si*FAD2-GUS transient expression vector는 plasmid midi kit (Qiagen, 미국)을 이용하여 plasmid를 추출한 다음, 1.6㎛ gold particle (Bio-rad, 미국)로 코팅하였다. 한번에 도입되는 DNA와 gold particle의 비율은 2ug DNA/500ug gold particle이었으며, particle bombardment (PDS1000/He gun, Bio-rad) 조건은 1100psi He gas 압력을 사용하였고 27℃에서 18시간 incubation 하였다. *Si*-FAD2 유전자의 프로모터에 의해 발현이 조절되는 외래 도입 유전자, GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법을 이용하여 조사하였다. 도 7b는 도 7a에서 보여지는 벡터를 참깨의 발달하는 종자에 particle bombardment 방법에 의거하여 도입한 다음, 종자에서 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법으로 조사한 것이다. a는 프로모터가 없는 pBI221 vector이고; b는 CaMV35S 프로모터가 있는 pBI221 vector이고; c는 *Si*-FAD2 유전자의 프로모터가 있는 p*Si*FAD2-GUS vector이다. 도 7b를 통해 참깨 유래 *Si*-FAD2 유전자의 프로모터는 참깨 종자에서도 정상적으로 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터임을 확인하였다.

【발명의 효과】

49> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에서는 참깨에서 유래된 microsomal oleic acid desaturase (*Si*-FAD2) 게놈 유전자 및 현재까지 밝혀지지 않은 *Si*-FAD2 유전자 프로모터의 염기서열을 제공하였다. 이러한 *Si*-FAD2 유전자 프로모터를 이용하여 외래 유전자를 식물체에서 발현시킨 결과, 식물체의 종자 발달 단계 특이적으로 발현을 유도하는 신규 프로모터임을 확인하였다. 따라서, 본 발명은 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법을 제공함으로써, 식물체의 종자 특이적으로 유용물질을 생산하거나, 기존의 종자 내 생산 물질을 기능적으로 변형시키고자 하는 형질전환 식물체 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호 3의 염기서열을 포함하는 식물체의 종자 특이적 발현 프로모터.

【청구항 2】

제 1항의 프로모터를 함유하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 상기 프로모터가 바이너리(binary) 벡터의 외래 유전자 앞에 삽입된 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 도 4a에 도시된 pBin*Si*FAD2-GUS인 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

【청구항 5】

제 2항에 있어서, 상기 프로모터가 트랜젼트(transient) 발현 벡터의 외래 유전자 앞에 삽입된 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 도 7a에 도시된 p*Si*FAD2-GUS인 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

【청구항 7】

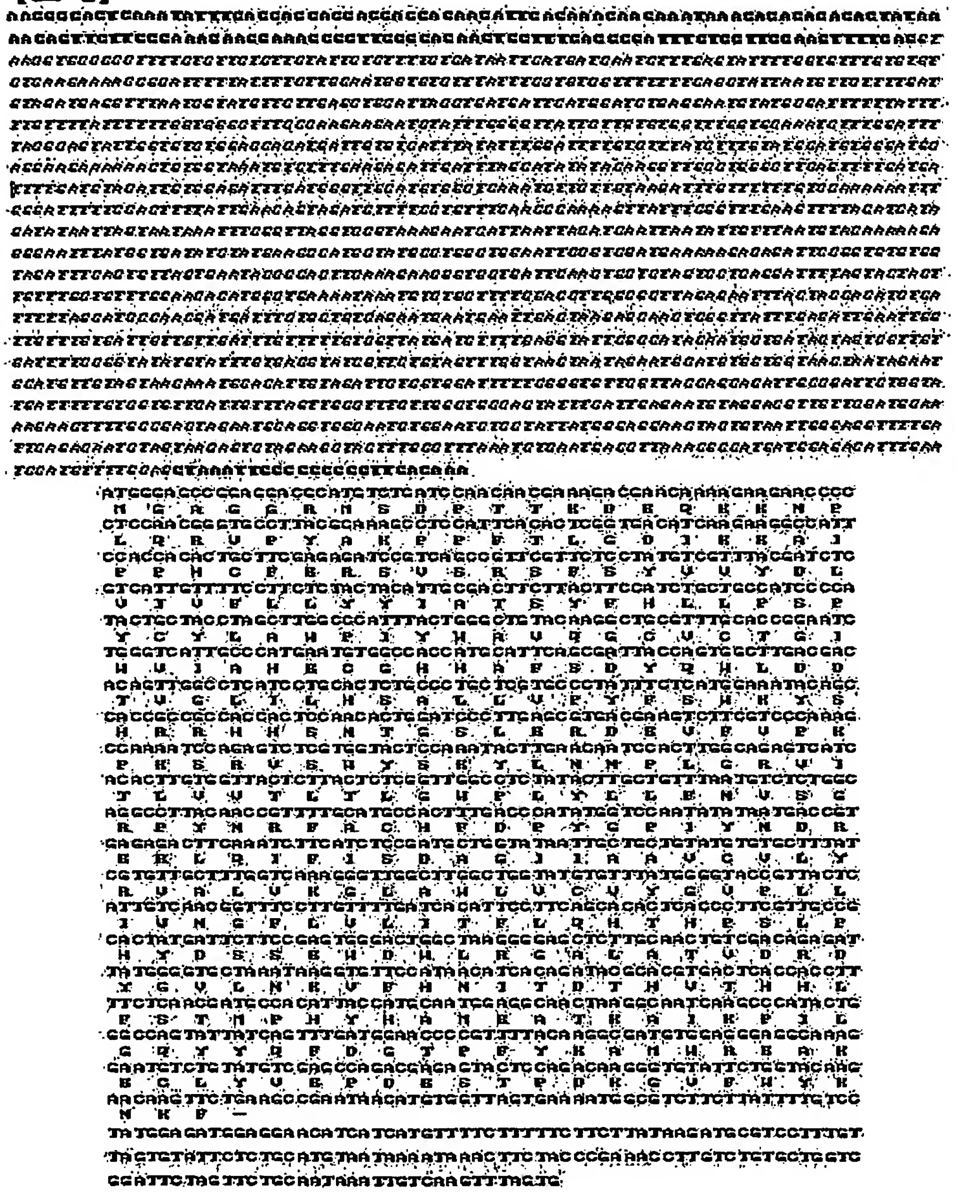
제 2항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 종자 특이적 발현 벡터로 형질전환된 식물체.

【청구항 8】

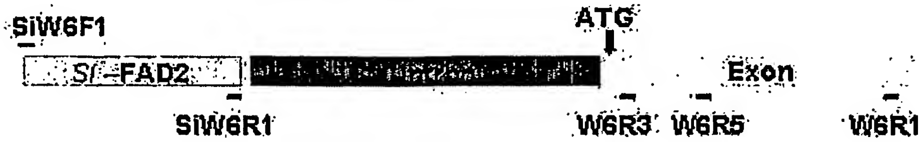
제 2항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 종자 특이적 발현 벡터를 식물체에 도입하여 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법.

【도면】

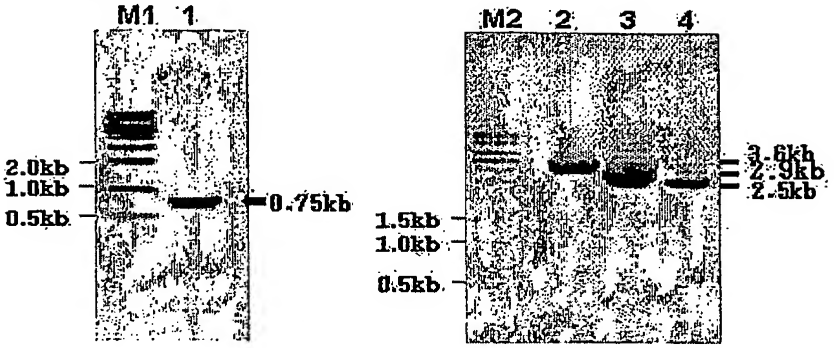
【도 1】



【도 2a】



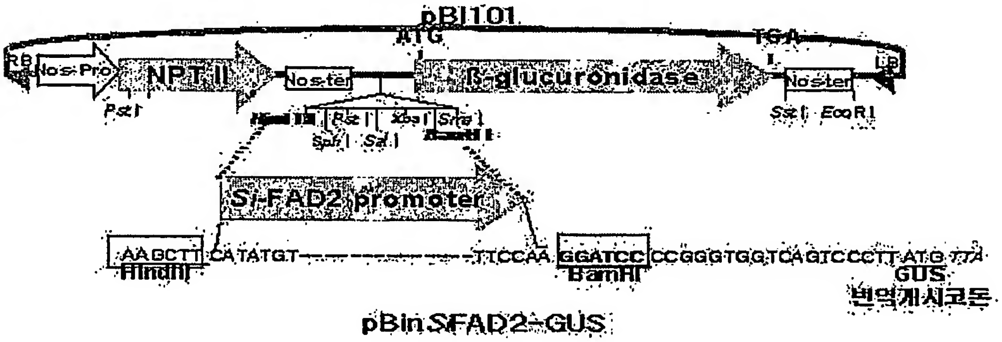
【도 2b】



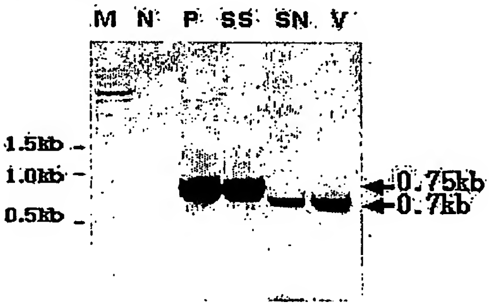
【도 3】

CATATGTGAAATGTAATGGAAAAATGCGACAAGAATTGCAATAGAGAAAATCCAATTTGCAGAGATTA
CATGAAAAGAATTTGTACAAATAGCATATATATGTTAAAATGAAATGGGACATGCCACATTATGTGG
AATAAAAAAAGACAATTTGCTTGGAATTAATTATAGAATAAATGTGTTACATTTAATATGTGATTAAT
CACTTTTTTTGAATTGTACATCTATCACATGACAAGTTCATTATATTTGACATATAATTTGTTTATG
TCTAGTCAAGCCTAATTAAATTTCTCGGAAAGCACAAAATTTTTTTGTCCTAACCAGGTTTGAACAA
GCAAACAAATCACAAAGCAGGTGTATCGCACTTGCGATGTGATCGGTCACTTTTTCTAAATTGTACA
TCATTCACACGACAACTGTATTGTGCTGCAAGTTCAATTGAGTGCGGTTGGAGCTATAATTTCCTTG
AACACACAATGTGGAATGTGCACACTCCATGTGGGCCAATGAGCGGATGACACGTGGCGGGCAACTT
ACCTCGTTACGTTGAGGCATGCATGAAAGGGGGATCTCTTGAGGTGGAGGGGTGGGGGCGGGGGTTG
GGGGGGGGCCCCTCCTCAGAGAGGTCTATATTTATGAGACCTCGTAAGGCAGAACGC

【도 4a】

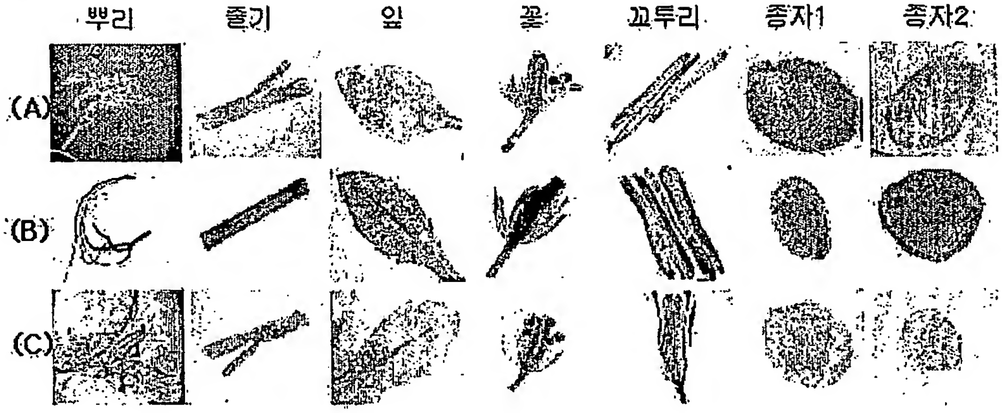


【도 4b】

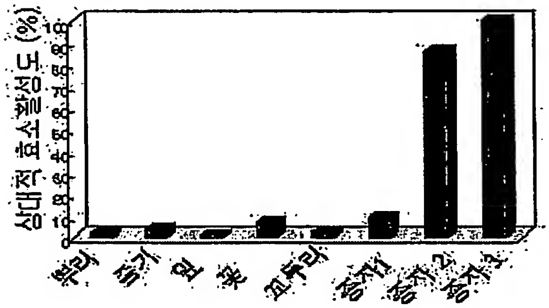


【도 4c】

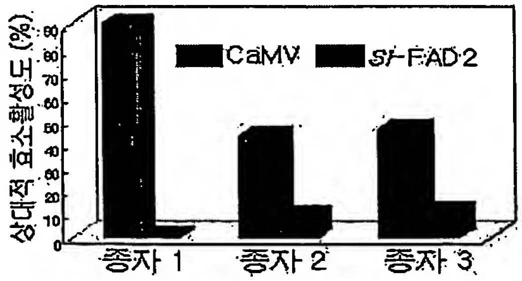
【도 5】



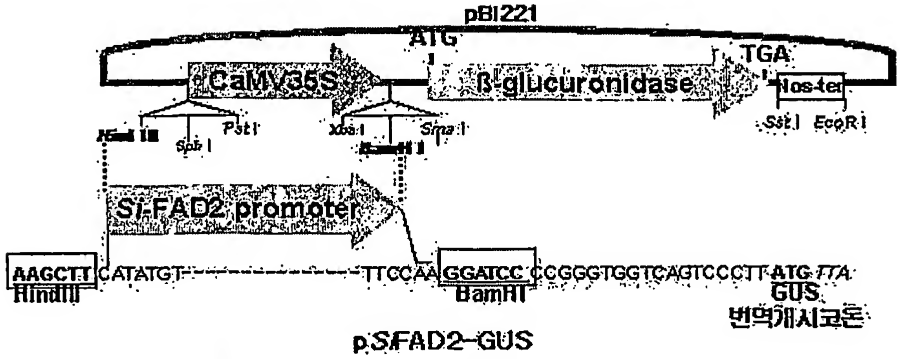
【도 6a】



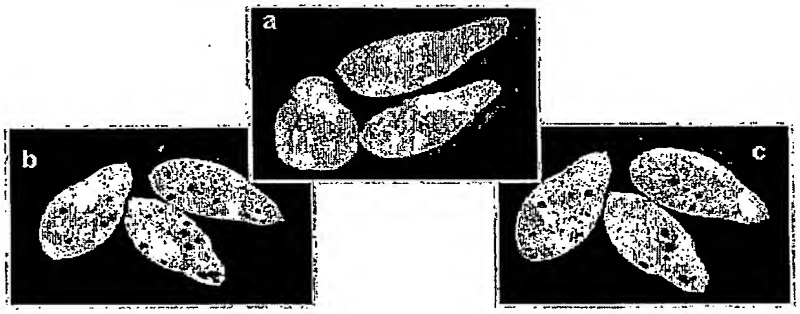
【도 6b】



【도 7a】



【도 7b】



【서열목록】

<110> KOREA CHUNGANG EDUCATIONAL FOUNDATION <120> Plant seed-specific expression promoter derived from sesame and seed-specific expression vector comprising the promoter <130> Gn13282 <160> 3 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 3102 <212> DNA <213> Sesamum indicum <220> <221> 5'UTR <222> (1)..(1746) <220> <221> intron <222> (67)..(1722) <220> <221> 3'UTR <222> (2899)..(3102) <400> 1 aacgccactc aaatatttca ccaccaccac caccagaaca ttcagaaaca agaaataaac 60 acacacacac tataaaacag ttcttgcgaa agaaggaaag cgcttccgca gaagtgcttt 120 cacgcgattt ctccttccaa gttttcaggt aacgtgcccc cttttctctt ctcttctatt 180 ctcttttctc ataattcatg atcaatcttt gagtattttg gtgtttgtgt gtctcaagaa 240 aaccgcattt ttattttctt gcaatggtgt ctttatttcc tgtcgttttt

ttcagctatt 300 aatgttcttt tgatgtagat gaggtttaat cgtatgttct tgagctgcat

tacctgatga 360 ttcatggatc tgaggaatgt atgcgatttt ttatttttgt tttatttttt

ggtgggcttt 420 cccaagaaga atctatttgg ggttattctt gtgtggtttg gtgcaaatct

ttggatttta 480 cgcagtattg gtgtctggac cacatgattg tgtcatttat atttggattt

tgtctttatc 540 tttgtatgca tgtgggatgc aggaagaaaa aactgtggta aatgtctttg

aagagattga 600 tttagcatat atacaaggtt gcctgggctt cagttttgat gattttgatg

tacattgtgg 660 agatttgatg ggttgcatgt ggctcaaatc ttcttgtaag atttgttttt

tgtccaaaaa 720 atttgggatt tttccacttt tattgaacag tagatctttt cctgtttcaa

cccaaaagtt 780 atttcggttt gaagttttac atcatagata taattagtaa taaatttcgg

ttaggtccgt 840 aaagaatcat taattacatc aattaatatt gtttaatgta caaaaagagg

gaatttatgg 900 tgatatctat gaagccatgc tatgcctggc tggaattccg tcgatgaaaa

agacagattc 960 cggtgtgtgg tagatttcac tgttagtgaa taccccactt caaagaacgg

tgctgattca 1020 actgctctag tcctcaggat tttagtacta cttgtttgct gtttggaaca

catggctgaa 1080 aataaatgtc tgcttttcga ccttggcgct tagagaattt actaccacat

ctcattttta 1140 gcatcccaac gatgatttct gctgtcagaa tgaatgaatt gactaagagc

aactcggtta 1200 tttgagattg aattggttgt ttgtgattgt tgttgatttg tttttgtcgt

tatgatcttt 1260 tgaggtattc gccatacaat gctgatacta gtcgttgtga ttttccggta

tatgtatttg 1320 tgacgtatcg ttctgtagtt tggtaactaa tagaatgcat gtggtggtaa

ctaatagaat 1380 gcatgttgta gtaacaaatg cacattgtag attctcgtgg atttttcggg

tgttcgttac 1440 cagcacattg ccgattctgg tatgattttt gtcgtgttca ttgtttagtt

gcctttcttg 1500 gctgccacta tttcattgag aatgtaggac gttgttcgat gcaaaagaac

ttttgccgac 1560 tagaatgcag gtggcaatct ggaatctcct attatgggag gaactactgt

aattgggagg 1620 ttttgattca gacaatctag taacagtcta gaagctactt tgcctttaaa

tctcaatgac 1680 cttaaacgcc atgatggaga catttgaatc catgttttgc aggtaaattg

ggggcggctt 1740 gacaaaatgg gagccggagg acgcatgtct gatccaacaa cgaaagacga

acaaaagaag 1800 aaccccctcc aacgggtgcc ttacgcaaag cctccattca cactcggtga

catcaagaag 1860 gccattccac cacactgctt cgagagatcc gtcagccgtt cgttctccta

tgtcgtttac 1920 gatctcgtca ttgttttcct tctctactac attgcgactt cttacttcca

tctgctgcca 1980 tccccatact gctacctagc ttggcccatt tactgggctg tacaaggctg

cgtttgcacc 2040 ggaatctggg tcattgccca tgaatgtggc caccatgcat tcagcgatta

ccagtggctt 2100 gacgacacag ttggcctcat cctgcactct gccctgctcg tgccctattt

ctcatggaaa 2160 tacagccacc gccgccacca ctccaacact ggatcccttg agcgtgacga

agtcttcgtc 2220 ccaaagccaa aatccagagt ctcgtggtac tccaaatact tgaacaatcc

acttggcaga 2280 gtcatcacac ttgtggttac tcttactctc ggttggcctc tatacttgct

gtttaatgtc 2340 tctggcaggc cttacaaccg ttttgcatgc cactttgacc catatggtcc

aatatataat 2400 gaccgtgaga gacttcaaat cttcatctcc gatgctggta taattgctgc

tgtatgtgtg 2460 ctttatcgtg ttgctttggt caaagggttg gcttggctgg tatgtgttta

tggggtaccg 2520 ttactcattg tcaacggttt ccttgttttg atcacattcc ttcagcacac

tcacccttcg 2580 ttgccgcact atgattcttc cgagtgggac tggctaaggg gagctcttgc

aactgtcgac 2640 agagattatg ggtgctaaa taaggtgttc cataacatca cagatacgca

cgtgactcac 2700 caccttttct caacgatgcc acattaccat gcaatggagg caactaaggc

aatcaagccc 2760 atactgggcc agtattatca gtttgatgga accccgtttt acaaggcgat

gtggagggag 2820 gcaaaggaat gtctgtatgt cgagccagac gagagtactc cagacaaggg

tgtattctgg 2880 tacaagaaca agttctgaag ccgaataaca tgtggttagt gaaaatggcg

tcttcttatt 2940 ttgtcctatg gagatggagg aacatcatca tgttttcttt ttcttcttat

aagatgcgtc 3000 ctttgttagt gtattctctg catgtaataa aataaacttc tacccgaaac

cttgtctgtg 3060 ctggtcggat tctagttctg caataaattg tcaagtttag tg

3102 <210> 2 <211> 383 <212> PRT <213> Sesamum indicum <400> 2 Met

Gly Ala Gly Gly Arg Met Ser Asp Pro Thr Thr Lys Asp Glu Gln 1 5

10 15 Lys Lys Asn Pro Leu Gln Arg Val Pro Tyr Ala Lys Pro Pro Phe

Thr 20 25 30 Leu Gly Asp Ile Lys Lys

Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Glu Arg Ser 35 40

45 Val Ser Arg Ser Phe Ser Tyr Val Val Tyr Asp Leu Val Ile Val Phe 50

55 60 Leu Leu Tyr Tyr Ile Ala Thr Ser Tyr Phe His Leu Leu Pro Ser

Pro 65 70 75 80 Tyr Cys Tyr Leu

Ala Trp Pro Ile Tyr Trp Ala Val Gln Gly Cys Val 85

90 95 Cys Thr Gly Ile Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala

Phe 100 105 110 Ser Asp Tyr Gln Trp Leu

Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Leu His Ser 115 120

125 Ala Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His 130

135 140 His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro

Lys 145 150 155 160 Pro Lys Ser Arg

Val Ser Trp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Leu 165

170 175 Gly Arg Val Ile Thr Leu Val Val Thr Leu Thr Leu Gly Trp Pro

Leu 180 185 190 Tyr Leu Leu Phe Asn Val

Ser Gly Arg Pro Tyr Asn Arg Phe Ala Cys 195 200

205 His Phe Asp Pro Tyr Gly Pro Ile Tyr Asn Asp Arg Glu Arg Leu Gln 210

215 220 Ile Phe Ile Ser Asp Ala Gly Ile Ile Ala Ala Val Cys Val Leu

Tyr 225 230 235 240 Arg Val Ala Leu

Val Lys Gly Leu Ala Trp Leu Val Cys Val Tyr Gly 245

250 255 Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Gly Phe Leu Val Leu Ile Thr Phe

Leu 260 265 270 Gln His Thr His Pro Ser

Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Asp 275 280

285 Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Val Leu 290

295 300 Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Thr His His

Leu 305 310 315 320 Phe Ser Thr Met

Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala Ile 325

330 335 Lys Pro Ile Leu Gly Gln Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Pro Phe

Tyr 340 345 350 Lys Ala Met Trp Arg Glu

Ala Lys Glu Cys Leu Tyr Val Glu Pro Asp 355 360

365 Glu Ser Thr Pro Asp Lys Gly Val Phe Trp Tyr Lys Asn Lys Phe 370

375 380 <210> 3 <211> 660 <212> DNA <213> Sesamum

indicum <220> <221> promoter <222> (1)..(660) <223> promoter of microsomal

oleic acid desaturase coding gene <400> 3 catatgtgaa atgtaatgga aaatgcgaca

agaattgcaa tagagaaaat ccaatttgca 60 gagattacat gaaaagaatt tgtacaaata

gcatatatat gttaaaatga aatgggacat 120 gccacattat gtggaataaa aaagacaatt

tgcttggaat taattataga ataaatgtgt 180 tacatttaat atgtgattaa tcactttttt

tgaattgtac atctatcaca tgacaagttc 240 attatatttg acatataatt tgtttatgtc

tagtcaagcc taattaaatt tctcggaaag 300 cacaaaattt ttttgtccta accaggtttg

aacaaccaaa caaatcacaa agcaggtgta 360 tcgcacttgc gatgtgatcg gtcacttttt

ctaaattgta catcattcac acgacaactg 420 tattgtgctc caagttcaat tgagtgcggt

tggagctata atttccttga acacacaatg 480 tggaatgtgc acactccatg tgggccaatg

agcggatgac acgtggcggg caacttacct 540 cgttacgttg aggcatgcat gaaaggggga

tctcttgagg tggaggggtg ggggcggggg 600 ttgggggggg gcccctcctc agacaggtct

atatttatga gacctcgtaa ggcagaacgc 660

660

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☑ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: ______________________

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.